

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 février 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/013485 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 31/00, 31/727, 39/05, 39/395, 45/06 // (A61K
39/395, 31:56, 38:20, 38:21) (A61K 31/727, 31:56, 38:20,
38:21) (A61K 39/05, 1:56, 38:20, 38:21)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/02777

(22) Date de dépôt international : 1 août 2002 (01.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

01/10354 1 août 2001 (01.08.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **CEN-
TRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE MONT-
PELLIER** [FR/FR]; 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud,
F-34000 Montpellier (FR). **CELLGEN SARL** [FR/FR];
314 rue du Mas du Juge, F-34980 St Gely du Fesc (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **KLEIN,
Bernard** [FR/FR]; 83 allée des Ecureuils, F-34980 Saint
Clément de Rivière (FR). **DE VOS, John** [BE/FR]; 5
plan des Cadres, F-34270 Saint Mathieu de Treviers (FR).
WANG, Yue Dan [CN/CN]; Soochow University, 48
Reumin Road, 215007 Suzhou Po (CN).

(74) Mandataires : **GILLARD, Marie-Louise** etc.; Cabinet
Beau de Loménie, 158 Rue De L'Université, F-75340 Paris
Cedex 07 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT (modèle
d'utilité), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ (modèle d'utilité), CZ, DE (modèle
d'utilité), DE, DK (modèle d'utilité), DK, DM, DZ, EC, EE
(modèle d'utilité), EE, ES, FI (modèle d'utilité), FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK (modèle d'utilité), SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reques

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 03/013485 A1

(54) Title: INHIBITORS OF HB-EGF (ERBB) RECEPTORS FOR TREATING MYELOMA

(54) Titre : INHIBITEURS DES RECEPTEURS DE HB-EGF (ERBB) POUR TRAITER LE MYELOME

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least an inhibitor of the heparin-binding epidermal growth factor or at least an inhibitor of the HB-EGF receptors, or ErbB receptors, or of at least an inhibitor of associated transduction pathways for preparing medicines useful for treating apoptosis and/or inhibiting IL-6 dependent plasmocytic tumor cell proliferation.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un inhibiteur du facteur de croissance épidermique (EGF) liant l'héparine (HB) ou d'au moins un inhibiteur des récepteurs de HB-EGF, ou récepteurs ErbB, ou d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées pour la préparation de médicaments utiles pour induire l'apoptose et/ou inhiber la prolifération des cellules tumorales plasmocytaires IL-6 dépendantes.

INHIBITEURS DES RECEPTEURS DE HB-EGF (ERBB) POUR TRAITER LE MYELOME

La présente invention est relative au traitement du myélome multiple. Elle
5 concerne plus particulièrement l'utilisation d'au moins un inhibiteur du
facteur de croissance épidermique (EGF) liant l'héparine (HB) ou d'au
moins un inhibiteur des récepteurs de HB-EGF, ou récepteurs ErbB ou
d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées pour la
préparation de médicaments utiles pour induire l'apoptose et/ou inhiber la
10 prolifération des cellules tumorales plasmocytaires IL-6 dépendantes.

La présente invention concerne également l'utilisation d'au moins un
inhibiteur du facteur de croissance épidermique liant l'héparine HB-EGF
ou d'au moins inhibiteur des récepteurs de HB-EGF, ou récepteurs ErbB
ou d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées en
15 combinaison avec au moins un inhibiteur de IL-6 ou au moins un inhibiteur
du récepteur de IL-6 ou au moins un inhibiteur des voies de transduction
associées pour la préparation de médicaments utiles pour induire
l'apoptose et/ou inhiber la prolifération des cellules tumorales
plasmocytaires IL-6 dépendantes.

20 L'interleukine 6 (IL-6) et les autres cytokines de la famille IL-6 sont des
facteurs de croissance importants des cellules malignes plasmocytaires
impliqués dans le myélome multiple (1,2).

On sait également que IL-6 est principalement produit par les cellules de
l'environnement de la moelle osseuse (2, 3) et que la production de IL-6
25 par ces cellules est induite après interaction avec les cellules de myélome
(4,5).

On a maintenant trouvé que le gène codant pour le facteur de croissance
épidermique liant l'héparine (HB-EGF) est surexprimé dans les cellules de
myélome et que la prolifération de lignées cellulaires de myélome induites

par IL-6 est liée à la présence d'une boucle autocrine CD9/HB-EGF/ErbB1.

HB-EGF est un facteur produit soit sous forme soluble, soit sous forme de protéine transmembranaire (6,7). la forme membranaire est le récepteur
5 de la toxine de la diphtérie. De plus, HB-EGF est un ligand des récepteurs du facteur de croissance épidermique (ErbB1 et ErbB4) (6,7). Il est produit par diverses cellules tumorales et agit en tant que facteur de croissance tumoral autocrine (6,7).

Les inhibiteurs du facteur HB-EGF qui conviennent aux fins de l'invention
10 sont toutes les substances capables d'inhiber la prolifération ou d'induire l'apoptose des cellules plasmocytaires tumorales par exemple dans les conditions définies dans les exemples illustratifs ci-après.

A titre d'exemples de substances capables d'inhiber le facteur HB-EGF, on peut citer notamment les héparines, en particulier l'héparine de bas
15 poids moléculaire, la toxine diphtérique et les anticorps anti-HB-EGF, en particulier les anticorps monoclonaux anti-HB-EGF, tels que ceux décrits dans les exemples illustratifs ci-après.

Les inhibiteurs du récepteur de HB-EGF qui conviennent aux fins de l'invention sont toutes les substances capables d'inhiber la prolifération ou
20 d'induire d'apoptose des cellules plasmocytaires tumorales par exemple dans les conditions définies dans les exemples ci-après.

Des exemples d'inhibiteurs des récepteurs ErbB appropriés sont notamment les anticorps monoclonaux anti-ErbB1, tels que par exemple l'anticorps monoclonal LA-1, commercialisé par UBI (Lake Placid NY
25 USA).

Les inhibiteurs de IL-6 qui peuvent être utilisés aux fins de l'invention sont par exemple les corticoïdes, l'IL-6 mutée ou d'autres inhibiteurs de l'IL-6 et les anticorps monoclonaux anti-IL-6, tels que notamment ceux dirigés contre la chaîne gp 80 ou la chaîne gp 130, par exemple les anticorps
30 monoclonaux B-E8, produits par la société Diaclone (Besançon) et les

inhibiteurs du récepteur de IL-6 tels que l'anticorps monoclonal B-R3, anticorps anti-transducteur de IL-6 gp 130, propriété de l'INSERM et Diaclone, produit par Diaclone.

Une dose efficace de chacun des inhibiteurs mis en œuvre selon
5 l'invention doit être utilisée selon des doses pharmacologiquement équivalentes, déduites des données expérimentales.

La dose efficace dépend, bien entendu, de l'état d'évolution du myélome, de l'âge, du profil biologique, de l'état clinique du patient et d'autres paramètres pharmacologiques dépendants du patient ou de son état
10 clinique, tels que par exemple la production quotidienne d'IL-6 calculée selon la méthode décrite par Lu et al. (13), le profil de prolifération, le taux de CRP/IL-6, l'isotype de la protéine monoclonale, les facteurs pronostiques du myélome, les fonctions vitales notamment la clearance à la créatinine, les fonctions hépatiques ,...).

15 La dose efficace peut être déterminée selon la méthode décrite par Lu et al (13).

En général, la dose d'inhibiteur de HB-EGF ou du récepteur de HB-EGF peut être comprise entre 10 et 1000 µg/mL de plasma.

La dose d'inhibiteur de IL-6 ou d'inhibiteur du récepteur de IL-6 peut être
20 comprise entre 10 et 1000 µg/mL de plasma.

Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique à action anti-myélome (action inhibitrice de la prolifération du myélome) contenant, en tant que principe actif, une quantité efficace d'au moins un inhibiteur de HB-EGF ou d'au moins un
25 inhibiteur des récepteurs de HB-EGF, en combinaison avec un excipient pharmaceutique acceptable.

Selon une variante préférée, la composition pharmaceutique selon l'invention contient, en tant que principe actif, une quantité efficace d'au moins un inhibiteur de HB-EGF ou au moins un inhibiteur des récepteurs
30 ErbB de HB-EGF, en particulier du récepteur ErbB1 ou du récepteur ErbB4, ou au moins un inhibiteur des voies de transduction en association avec une quantité efficace d'au moins un inhibiteur de IL-6 ou d'au moins

un inhibiteur du récepteur de IL-6, ou d'un inhibiteur des voies de transduction induites par l'IL-6, lesdits inhibiteurs étant conditionnés ensemble ou séparément avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

- 5 On peut utiliser un véhicule pharmaceutiquement acceptable classique quelconque, tel que par exemple une solution contenant un stabilisateur d'anticorps monoclonal ou de l'albumine humaine, de préférence, on utilise un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié pour une administration parentérale.
 - 10 L'invention a également pour objet un procédé de traitement du myélome qui consiste à administrer aux patients ayant un myélome une quantité efficace d'au moins un inhibiteur de HB-EGF ou d'au moins un inhibiteur du récepteur de HB-EGF ou d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées éventuellement en combinaison avec une quantité
 - 15 efficace d'au moins un inhibiteur de IL-6 ou d'au moins un récepteur de IL-6 ou d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées, l'administration desdits inhibiteurs étant concomitante ou séquentielle, déterminée selon les données déduites de paramètres pharmacologiques ou de données cliniques.
 - 20 La présente invention va être maintenant décrite plus en détail par les tests qui ont été réalisés et qui mettent en évidence que, dans le cas du myélome, on peut inhiber la prolifération des cellules plasmocytaires malignes ou provoquer l'apoptose de ces cellules.
- Dans les tests reportés ci-après, on a utilisé les lignées cellulaires de
- 25 myélome humaines (HMCL) XG-1, XG-6, XG-13 et XG-14 obtenues dans l'Unité de Thérapie Cellulaire du CHU de Montpellier et l'unité INSERM U475 à Montpellier et qui ont été décrites dans la littérature (8, 9, 10).
- On sait que la croissance de ces quatre lignées cellulaires de myélome, XG-1, XG-6, XG-13 et XG-14, est strictement dépendante de l'addition
- 30 d'IL-6 exogène. Lors du retrait de IL-6, ces cellules subissent une apoptose progressive en 3 à 4 jours. Les HMCL ont été maintenues dans

du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20 (Biowittaker, Maryland, US) et 5 ng/ml de IL-6.

Dans ces tests, on a utilisé :

- les EGF et EGF recombinants commercialisés par R&D System (Minneapolis, MN, USA),
- la toxine diphtérique mutée commercialisée par Sigma (St. Louis, MO, USA),
- l'anticorps neutralisant dirigé contre HB-EGF commercialisé par R&D System,
- l'anticorps monoclonal (mAb) LA-1 neutralisant dirigé contre le récepteur ErbB1 produit par UBI (Lake Placid, NY USA) et commercialisé par EUROMEDEX (Souffelweyersheim, France),
- les immunoglobulines de chèvre purifiées commercialisées par TEBU (Le Perray en Yvelines, France).
- l'anticorps monoclonal anti-transducteur de IL-6 gp 130 B-R3 neutralisant décrit par Wijdenes et al. (11).

Les méthodes mises en œuvre dans ces tests vont maintenant être décrites en détail

Expression de gènes signal intercellulaires dans des cellules de myélome

L'expression de 268 gènes codant des protéines signal intercellulaires a été évaluée sur des lignées cellulaires de myélome (HMCL) et des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) infectées avec le virus de Epstein-Barr (LCL) avec les membranes à ADN ATLAS selon la technique de ClonTech (Bâle, Suisse).

L'ARN poly (A+) a été extrait de chaque cellule et utilisé pour synthétiser de l'ADNc marqué par un élément radioactif (^{32}P).

Les ADNc radiomarqués ont ensuite été hybridés à deux puces d'ADN identiques selon la technique préconisée par Clontech et la radioactivité a été analysée par Phospho Imager (Amersham, Saclay, France).

Analyse par cytométrie de flux

L'expression de ErbB1 a été évaluée en incubant 5×10^5 cellules de myélome avec 0,5 µg d'anticorps monoclonal de souris anti-récepteur de EGF (anti-EGF-R) humain (LA1) ou un anticorps monoclonal de souris ne reconnaissant pas les antigènes humains (Immunotech, Marseille, France) dans du tampon phosphate (PBS) contenant 30% de sérum AB à 4°C pendant 30 minutes. Ensuite, les cellules ont été lavées et incubées avec un anticorps monoclonal de chèvre anti-souris conjugué avec du polyéthylèneglycol (PE) (Immunotech, Marseille, France) dans du PBS contenant 30% de sérum AB à 4°C pendant 30 minutes.

Le HB-EGF membranaire a été détecté en marquant 5×10^5 cellules de myélome avec 0,5 µg d'anticorps de chèvre anti HB-EGF humain ou 1% de sérum de chèvre dans du PBS contenant 100 µg/ml d'immunoglobulines (Ig) à 4°C pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées et incubées avec des immunoglobulines de porc anti-chèvre conjuguées au FITC, dans du PBS contenant 100 µg/ml à 4°C pendant 30 minutes. Le pourcentage de cellules marquées et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) ont été déterminés par le cytomètre de flux de type FACScan (Becton Dickinson, USA), ou autres.

20

Tests de prolifération des cellules

Les cellules ont été cultivées pendant 5 jours dans des microplaques de titrage à fond plat et à 96 puits à raison de 10^4 cellules/puits dans du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20. Différentes concentrations de cytokines ou de facteurs de croissance ou d'inhibiteurs de cytokines/facteurs de croissance ont été ajoutées au début de la culture dans 6 puits de culture par groupe. A la fin de la culture, les cellules ont été marquées avec de la thymidine tritiée (Amersham, Orsay, France) pendant 12 heures, récoltées et comptées selon le mode opératoire décrit par De Vos et al (12).

30

Croissance à long terme de cellules de myélome

- Pour examiner les effets de EGF ou IL-6 sur la croissance à long terme des cellules de myélome, les cellules ont été lavées une fois avec du milieu de culture, incubées pendant 5 h à 37°C dans du milieu de culture
- 5 X-VIVO 20 et lavées de nouveau deux fois.
- Elles ont été ensuite cultivées à la concentration cellulaire de 10^5 cellules/ml avec HB-EGF (50 µg/ml) ou IL-6 (500 pg/ml) avec ou sans 10 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-gp130 neutralisant, BR-3 (INSERM/Diaclone) ou avec ou sans 10 µg/ml d'anticorps monoclonal
- 10 anti-ErbB1 neutralisant (LA-1).

Détection des cellules apoptotiques

- Les cellules de myélome ont été cultivées pendant 3 à 4 jours dans des microplaques à fond plat à raison de 3×10^5 cellules par puits dans du milieu de culture X-VIVO 20 avec différentes quantités d'IL-6/facteur
- 15 de croissance HB-EGF ou d'inhibiteurs d'IL-6/facteur de croissance HB-EGF.

- A la fin de la culture, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et mises en suspension dans une solution d'annexine-V-FITC (dilution 1/50
- 20 dans du tampon HEPES : 10mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl et 5 mM CaCl_2).

- Elles ont été incubées pendant 20 minutes à température ambiante et lavées deux fois avec le tampon HEPES. La fluorescence a été analysée par un cytomètre à flux FACSan.
- 25 On a produit de l'ADNc avec 2 µg total d'ARN en utilisant la transcriptase reverse Superscript II (Life Technologies) et l'oligo d(T)₁₂₋₁₈ (Amersham Pharmacia Biotech) à titre d'amorce. Chaque portion de 25 µl de PCR contenait 1 µl de l'ADNc premier brin, 1 µM de chaque amorce (sens et antisens), 0,2 mM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 1 × tampon pour
- 30 polymérase, 2 U de *Taq* polymérase (Life Technologies) et 1 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -

dCTP (Amersham Pharmacia Biotech). On a utilisé les amorces suivantes :

- Tyro3 5'-CAC TGA GCT GGC TGA CTA AGC CCC (sens) et
- 5'-AAT GCA TGC ACT TAA GCA GCA GGG (antisens) ;
- 5 - HB-EGF 5'-TGG TGC TGA AGC TCT TTC TGG (sens) et
- 5'- GTG GGA ATT AGT CAT GCC CAA (antisens) ;
- FRZB 5'-AAG TCT GGC AGG AAC TCG AA (sens) et
- 5'-ACT TCC TGG TGC TTG ATT GC (antisens) ;
- 10 - β_2 -microglobuline (β_2 -M) 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC
- (sens) et 5'-GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG (antisens).

Les tailles des produits de la PCR étaient pour Tyro3 344 pdb, HB-EGF 605 pdb, FRZB (Frizzled-related receptor B) 599 pdb, β_2 -M 269 pdb. Le profil d'amplification était de 1 minute à 94°C, 45 secondes à 59°C (Tyro3) ou à 62°C (HB-EGF) ou à 60°C (FRZB ou β_2 -M), 1 minute à 72°C, opérations suivies par une extension finale de 10 minutes à 72°C. Le nombre de cycles était de 26 pour Tyro3, de 32 pour HB-EGF et de 25 pour FRZB ou β_2 -M. On a effectué une électrophorèse des produits réactionnels sur du gel de polyacrylamide à 4%, on les a séchés et on les a exposés à des films rayon X.

20

Exemple 1 : action critique de HB-EGF autocrine sur la survie et la prolifération des cellules de myélome

HB-EGF est un gène dont l'expression peut être liée à la pathobiologie du myélome multiple (MM). En utilisant les puces ADN, on a trouvé que le gène *HB-EGF* était surexprimé de façon marquée dans 3 lignées de myélome (HMCL : XG-1, XG-7 et XG-14) et dans aucune des 4 LCL. On a recherché l'expression du gène *HB-EGF* par RT-PCR dans les lignées cellulaires et dans des cellules primaires. On a détecté l'ARNm de HB-EGF dans 3/6 HMCLs, mais dans aucune des 4 LCL, ce qui confirme les résultats obtenus avec les puces ADN. De façon intéressante, tandis que l'ARNm de HB-EGF n'a pas pu être amplifié par RT-PCR dans des

30

cellules plasmatiques malignes purifiées à partir de 4 des 4 cas de PCL, on a trouvé une forte expression dans des cellules médullaires purifiées à partir de 2 patients atteints de MM. Dans des cellules plasmatiques normales, on a noté une expression faible dans 1 des 4 échantillons. Le

5 gène *ErbB1*, à la différence du gène *ErbB4*, a été hautement exprimé dans les cellules de MM, ainsi que dans les LCL, ce qui suggère que HB-EGF peut être un facteur de croissance autocrine des cellules tumorales, en se fixant à son récepteur Erb-B1. On a donc recherché si le blocage de l'activité de HB-EGF pouvait moduler la prolifération de la lignée des

10 cellules de MM XG-1 qui a hautement exprimée le gène *HB-EGF*. Comme souligné sur la Figure 1A, l'addition d'un anticorps de neutralisation à HB-EGF a bloqué la prolifération de XG-1 d'une façon dose-dépendante. Avec 50 µg/ml d'anticorps anti-HB-EGF, l'inhibition est montée jusqu'à 80%. Cet effet inhibiteur a été inversé par addition d'une quantité en

15 excès de HB-EGF recombinant, ce qui démontre la spécificité des effets de blocage de l'anticorps (Figure 1B). Au contraire, l'anticorps anti-HB-EGF n'a pas eu d'effet sur la prolifération de EBV-1 LCL (Figure 1C). Ces observations montrent clairement que HB-EGF est un nouveau facteur de croissance impliqué dans la survie de IL-6 et la prolifération des

20 cellules de myélome XG-1.

Le HB-EGF membranaire a aussi été mis en évidence sur les cellules de myélome en incubant ces cellules incubées avec des anticorps de chèvre anti-HB-EGF ou du sérum de chèvre témoin puis avec un anticorps de porc anti-Ig de chèvre conjugué à FITC. La fluorescence a été analysée

25 avec un cytofluoromètre FACScan. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative de deux expériences.

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2 sur laquelle on a porté en abscisses l'intensité de fluorescence et en ordonnées le nombre de cellules comptées.

30 Ces résultats montrent que le HB-EGF membranaire est présent à la surface des cellules. Le marquage était plus intense avec les cellules XG-

1 et XG-14, qui ont présenté une plus forte expression du gène de HB-EGF déterminée par la technique des puces ADN « cytokine/récepteur » ou par RT-PCR, ainsi que le montrent les données du tableau I ci-après :

5 TABLEAU 1 : Expression de gènes déterminée par des membranes à ADN ATLAS (Les valeurs en dessous de 20 sont considérées comme non significatives)

		XG-1	XG-14	XG-6	XG-13
10	HB-EGF	2890	1020	263	166
	EGF	6	1	1	54
	ErbB1	5549	3635	559	783
	ErbB2	71	75	60	42
	ErbB3	35	52	124	101
	ErbB4	17	9	180	25

15

Exemple 2 : Inhibition par la toxine diphtérique mutée de la prolifération des cellules de myélome induite par IL-6

Des cellules de myélome (10^4 cellules/puits) ont été cultivées pendant 5 jours dans du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20 avec 500 pg/ml de IL-6 et une concentration progressive de toxine diphtérique mutée (mDT). Dans un groupe de culture, 1 µg/ml de HB-EGF recombinant a été ajouté au début de la culture en même temps que 100 µg/ml de mDT et 500 pg/ml de IL-6. Les résultats sont les moyennes \pm ET de l'incorporation de thymidine tritiée déterminée sur des puits de culture en sextuple. Les résultats qui sont reportés sur la figure 3 sont ceux d'une expérience représentative de 3 à 4 expériences, selon les lignées cellulaires.

* indique une différence statistique de la valeur moyenne par rapport à celle du groupe de cellules cultivées sans mDT ou HB-EGF ($P < 0,05$, testé avec un test T de Student). ** indique une différence statistique de la valeur moyenne par rapport à celle du groupe de cellules cultivées avec 100 µg/ml de mDT.

La figure 3 montre que ce HB-EGF autocrine est critique pour promouvoir la croissance de 2/4 HMCLs dépendantes de IL-6, les HMCL XG-1 et XG-14. En réalité, la toxine diphtérique mutée (mDT), qui est un inhibiteur spécifique de HB-EGF a fait décroître la prolifération des HMCL induite par IL-6. L'effet inhibiteur de mDT était compensé par l'addition d'un excès de HB-EGF recombinant, ce qui indique qu'il n'était pas dû à une toxicité non spécifique de la DT mutée (figure 3).

Exemple 3 : Un antagoniste de HB-EGF n'inhibe pas la prolifération de cellules de myélome cultivées avec de hautes concentrations de IL-6

Des cellules de myélome (10^4 cellules/puits) ont été cultivées pendant 5 jours dans du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20 (A) avec 500 pg/ml ou 5 ng/ml de IL-6 et une concentration progressive de toxine diphtérique mutée (mDT), (B) avec des concentrations progressives de IL-6. Les résultats reportés sur la figure 4 sont des moyennes \pm ET de l'incorporation de thymidine tritiée déterminée sur des puits de culture en sextuple. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative de deux expériences.

L'inhibition par mDT ou par des anticorps anti-HB-EGF de la prolifération de cellules de myélome dépendante de IL-6 a été observée de manière reproductible quand des cellules de myélome ont été stimulées avec une concentration de IL-6 de 100-500 pg/ml (figure 4a). Avec une plus grande concentration de IL-6 (5 ng/ml), aucune inhibition statistiquement significative n'a pu être observée (figure 4a). Il est à noter qu'une grande prolifération des 4 HMCL était déjà atteinte avec 100-500 pg/ml de IL-6 et n'a pas pu être augmentée par addition de 10-30 fois plus de IL-6 (figure 4b).

Exemple 4 : Induction de l'apoptose de cellules de myélome par un antagoniste de HB-EGF

Des cellules de myélome ont été cultivées pendant 3 jours avec 500 pg/ml de IL-6 avec ou sans 100 μ g/ml de toxine diphtérique mutée. Dans un groupe, 1 μ g/ml de HB-EGF a été ajouté au début de la culture en même

temps que 500 pg/ml de IL-6 et 100 µg/ml de toxine diphtérique mutée. L'apoptose a été évaluée par marquage à l'annexine V et analyse par cytofluorimétrie. Les nombres dans les panneaux indiquent le pourcentage de cellules positives pour l'annexine V en apoptose. Les résultats reportés sur la Figure 5 sont ceux de l'expérience représentative de deux expériences.

Au moyen d'un marquage avec l'annexine V, mDT s'est révélée induire une apoptose dans les 2 HMCLs XG-1 et XG-14 (figure 5), avec une majorité de cellules de myélome (87 % et 62 %) en apoptose avec 100 µg/ml de mDT. L'apoptose induite par mDT était compensée par addition d'une grande quantité de HB-EGF recombinant capable de contrebalancer la mDT (figure 5).

Exemple 5 : Expression de ErbB1 sur des cellules de myélome

Des cellules de myélome ont été marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre ErbB1 ou un anticorps monoclonal murin témoin ne reconnaissant aucun antigène humain. Puis, les cellules ont été marquées avec un anticorps de chèvre anti-Ig murine conjugué à PE. La fluorescence a été analysée avec un cytofluorimètre FACSScan. Les résultats reportés sur la figure 6 sont ceux d'une expérience représentative de trois expériences. Les cellules de myélome XG-1 et XG-14 exprimaient la plus grande densité de ErbB1.

Ces résultats sont en accord avec ceux du Tableau 1, montrant que les cellules de myélome expriment largement le gène de ErbB1 et plus faiblement et de manière non reproductible les autres récepteurs de la famille EGF-R.

Exemple 6 : Inhibition par les anticorps monoclonaux anti-ErbB1 de la prolifération des cellules de myélome induite par IL-6

Des cellules de myélome (10^4 cellules/puits) ont été cultivées pendant 5 jours dans du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20 avec 500 pg/ml de IL-6 et une concentration progressive d'un anticorps monoclonal anti-

ErbB1 (0-10 µg/ml). Dans un groupe de culture, 1 µg/ml de HB-EGF recombinant a été ajouté au début de la culture en même temps que 10 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-ErbB1 et 500 pg/ml de IL-6. Les résultats sont des moyennes \pm ET de l'incorporation de thymidine tritiée déterminée sur des puits de culture en sextuple. Les résultats représentés sur la figure 7 sont ceux d'une expérience représentative de deux à trois expériences, selon les lignées cellulaires. * indique une différence statistique de la moyenne par rapport à celle du groupe de cellules cultivées sans mAb anti-ErbB1 ou HB-EGF ($p < 0,05$, testé avec un test T de Student). ** indique une différence statistique de la moyenne par rapport à celle du groupe de cellules cultivées avec 10 µg/ml de mAb anti-ErbB1.

Les résultats de la figure 7 montrent que la prolifération des cellules XG-1 et XG-14 était fortement inhibée par l'anticorps anti-ErbB1 à une concentration (10 µg/ml). L'effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal anti-ErbB1 était compensé par addition d'une grande quantité de HB-EGF recombinant. Il est à noter que les lignées cellulaires de myélome n'expriment pas le gène de EGF (tableau 1). La forte inhibition de la prolifération des cellules XG-1 et XG-14 par l'anticorps monoclonal anti-ErbB1 est en accord avec leur haute expression du gène de HB-EGF, une inhibition marquée par des antagonistes de HB-EGF et une expression de ErbB1 détectable par FACS. Globalement, ces données montrent que la survie et la prolifération, induites par IL-6, des lignées cellulaires de myélome XG-1 et XG-14 dépend d'une boucle autocrine HB-EGF/ErbB1.

25

Exemple 7 : Inhibition par les anticorps monoclonaux anti-IL-6 ou anti ErbB1 de la prolifération des cellules de myélome induite par IL-6

Des cellules de myélome XG-1 ont été cultivées en présence de 100 pg/ml d'interleukine-6 (IL-6) dans du milieu X-VIVO20 pendant 96 heures.

30

Au jour 0, différentes concentrations d'un anticorps monoclonal anti-IL-6 (B-E8) et/ou d'un anticorps monoclonal anti-ErbB1 (LA-1) ont été ajoutées.

- Les résultats de la figure 8 montrent que l'anticorps monoclonal anti-ErbB1 potentialise l'effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal anti-IL-6 sur la prolifération dépendante d'IL-6 des cellules.

Exemple 8 : Expression de la tétraspanine CD9 par les lignées de myélome

- Des cellules de myélome ont été cultivées pendant 2 jours dans du milieu de culture X-VIVO 20 avec 0,2ng/mL ou 2ng/mL d'IL-6, et l'expression de CD9 a été évaluée par marquage avec un anticorps monoclonal anti-CD9 conjugué à la phycoérythrine. Le pourcentage de cellules marquées et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) ont été déterminés au moyen d'un cytofluorimètre FASCscan. Les résultats sont ceux d'une expérience parmi deux expériences représentatives.

- La IMF obtenue avec l'anticorps témoin d'isotype correspondant a été fixée entre 3 et 5. Les résultats du tableau 2 (ci-après) montrent que les lignées XG-1 et XG-14 expriment fortement la tétraspanine CD9. Cette expression n'est pas régulée par l'IL-6. Les lignées XG-1 et XG-13 l'expriment très faiblement. La tétraspanine CD9 étant un récepteur de HB-EGF, capable d'augmenter très fortement son activité biologique, ces données renforcent l'importance d'une boucle autocrine CD9/HB-EGF/Erb-B1 dans le contrôle de la prolifération des lignées XG-1 et XG-14 médiée par l'IL-6.

TABLEAU 2 : Expression de CD9 sur les cellules myélomateuses

IL-6	XG-1		XG-14		XG-6		XG-13	
	Cellules viables marqués (%)	IMF	Cellules viables marqués(%)	IMF	Cellules viables marqués(%)	IMF	Cellules viables marqués(%)	IMF
2 ng/ml	100	418	100	108	35	17	37	18
0.2 ng/ml	100	393	100	91	30	19	39	17

Exemple 9 : Inhibition de la prolifération des cellules de myélome par un anticorps monoclonal anti-CD9

Pour examiner si CD9 est critique pour promouvoir la survie des cellules de myélome à médiation par IL-6, on a utilisé un mAb dirigé contre CD9.

- 5 Des cellules de myélome (10^4 cellules/puits) ont été cultivées pendant 5 jours dans du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20 avec 500 pg/ml de IL-6 et 50 μ g/ml du mAb anti-CD9 SYB-1. Dans un groupe de culture, 1 μ g/ml de HB-EGF recombinant a été ajouté au début de la culture en même temps que 10 μ g/ml de mAb anti-CD9 SYB-1 et 500 pg/ml de IL-6.
- 10 Les résultats sont des moyennes \pm ET de l'incorporation de thymidine tritiée déterminée sur des puits de culture en sextuple. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative de deux expériences. * indique une différence statistique de la moyenne par rapport à celle du groupe de cellules cultivées sans mAb anti-CD9 ou HB-EGF ($P < 0,05$, testé avec un
- 15 test T de Student).

Comme le montre la figure 9, l'anticorps monoclonal anti-CD9 SYB-1 a pu bloquer la prolifération des cellules de myélome XG-1. Cette inhibition a été compensée par l'addition d'une grande quantité de HB-EGF recombinant qui peut entrer en compétition avec l'anticorps monoclonal

20 anti-CD9 pour la liaison à CD9.

Exemple 10 : Effets synergiques de IL-6 et HB-EGF pour déclencher la survie et la prolifération des cellules de myélome

- Des cellules de myélome XG-1 ou XG-14 ont été cultivées à raison de 10^5
- 25 cellules/ml dans du milieu de culture sans sérum X-VIVO 20 avec 10 μ g/ml d'un anticorps monoclonal murin ne reconnaissant aucun antigène humain et sans cytokine, ou avec 500 pg/ml de IL-6 ou 100 ng/ml de HB-EGF recombinant. Dans certains groupes de culture, 10 μ g/ml d'anticorps monoclonal anti-transducteur de IL-6 gp130 B-R3
- 30 neutralisant ou d'anticorps monoclonal anti-ErbB1 LA-1 neutralisant ont été ajoutés. Tous les 3 à 4 jours, la viabilité des cellules et le nombre de cellules ont été testés, et les cellules ont été cultivées de nouveau à

raison de 10^5 cellules/ml avec du milieu de culture frais contenant pour chaque groupe les concentrations initiales de cytokine et/ou d'inhibiteur de cytokine. Les résultats sont les nombres de cellules cumulés produits dans la culture d'une expérience représentative de trois expériences.

- 5 Comme le montre la figure 10, en l'absence de IL-6, les deux lignées cellulaires de myélome XG-1 et XG-14 ne se sont pas développées et sont mortes progressivement en 4 à 5 jours. L'addition de IL-6 a induit une croissance vigoureuse. La croissance induite par IL-6 a été totalement abolie par le mAb anti-gp 130 neutralisant. Elle a été également
- 10 totalement abolie par l'anticorps monoclonal anti-ErbB1 neutralisant en accord avec les données ci-dessus. HB-EGF recombinant a favorisé la survie des cellules de myélome XG-1 et XG-14 et une croissance qui était plus faible que celle induite par IL-6. La faible croissance des cellules de myélome à médiation par HB-EGF recombinant a été inhibée par
- 15 l'anticorps monoclonal anti-ErbB1. Elle a également été totalement inhibée par l'anticorps monoclonal anti-gp130 neutralisant. Cette expression autocrine du gène de IL-6 a été détectée aussi avec les puces ADN ATLAS dans des cellules XG-1 et dans les autres lignées cellulaires de myélome (voir tableau 1) et confirmé par RT-PCR (Figure 11).
- 20 Prises en combinaison, ces données indiquent que la faible croissance des cellules de myélome avec HB-EGF-recombinant est liée à cette faible production autocrine de IL-6 par les cellules de myélome. On en déduit qu'il existe une coopération des voies de transduction induites par le transducteur de IL-6 gp130 et ErbB1 pour déclencher une survie et une
- 25 prolifération optimales des cellules de myélome.

Références

1. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoka H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T.
5 Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. *Nature*. 1988;332:83-85
2. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*.
10 1989;73:517-526
3. Portier M, Rajzbaum G, Zhang XG, Attal M, Rusalen C, Wijdenes J, Mannoni P, Maraninchi D, Piechaczyk M, Bataille R, Klein B. In vivo interleukin-6 gene expression in the tumoral environment in multiple myeloma. *Eur.J.Immunol*. 1991;21:1759-1762
- 15 4. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa b. *Blood*. 1996;87:1104-1112
5. Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger RA, van
20 Oers R, Bloem AC. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1994;84:2269-2277
6. Davis-Fleischer KM, Besner GE. Structure and function of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF. *Front Biosci*.
25 1998;3:d288-299.
7. Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11:335-344.
8. Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, Boiron JM, Bataille R, Klein B. Reproducible obtaining of human myeloma
30 cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*. 1994;83:3654-3663

9. Rebouissou C, Wijdenes J, Autissier P, Tarte K, Costes V, Liautard J, Rossi JF, Brochier J, Klein B. A gp130 Interleukin-6 Transducer-Dependent SCID Model of Human Multiple Myeloma. *Blood*. 1998;91:4727-4737
- 5 10. Gu ZJ, Wijdenes J, Zhang XG, Hallet MM, Clement C, Klein B. Anti-gp130 transducer monoclonal antibodies specifically inhibiting ciliary neurotrophic factor, interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor or oncostatin M. *J.Immunol.Methods*. 1996;190:21-27
- 10 11. Wijdenes J, Clement C, Klein B, Morel-Fourrier B, Vltá N, Ferrara P, Peters A. Human recombinant dimeric IL-6 binds to its receptor as detected by anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Mol.Immunol*. 1991;28:1183
- 15 12. De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br.J.Haematol*. 2000;109:823-828
- 20 13. (Lu ZY, Brailly H, Widjenes J, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Measurement of whole body interleukin-6 (IL-6) production : prediction of the efficacy of anti-IL-6 treatments. *Blood* 1995, 86 : 3123-3131)

Revendications

1. Utilisation d'au moins un inhibiteur du facteur de croissance épidermique (EGF) liant l'héparine (HB) ou d'au moins un inhibiteur des récepteurs de HB-EGF, ou récepteurs ErbB, ou d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées pour la préparation de médicaments utiles pour induire l'apoptose et/ou inhiber la prolifération des cellules tumorales plasmocytaires IL-6 dépendantes.
2. Utilisation d'au moins un inhibiteur du facteur de croissance épidermique liant l'héparine HB-EGF ou d'au moins un inhibiteur des récepteurs de HB-EGF, ou récepteurs ErbB, ou d'au moins un inhibiteur des voies de transduction associées en combinaison avec au moins un inhibiteur de IL-6 ou au moins un inhibiteur des récepteurs de IL-6, ou au moins un inhibiteur des voies de transduction associées, pour la préparation de médicaments utiles pour induire l'apoptose et/ou inhiber la prolifération des cellules tumorales plasmocytaires IL-6 dépendantes.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur du facteur de croissance épidermique liant l'héparine HB-EGF est choisi parmi les héparines, en particulier l'héparine de bas poids moléculaire, la toxine diphtérique, les anticorps anti-HB-EGF.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermique liant l'héparine HB-EGF sont choisis parmi les anticorps monoclonaux anti-ErbB ou autre récepteurs de HB-EGF ou les inhibiteurs des voies de transduction associées.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'inhibiteur de IL-6 est choisi parmi les

corticoïdes, les inhibiteurs de la production d'IL-6, les anticorps monoclonaux anti IL-6, l'interleukine-6 mutée antagoniste.

- 5 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'inhibiteur du récepteur de IL-6 est dirigé contre la chaîne gp80 ou gp130 ou sont des inhibiteurs des voies de transduction associées.
- 10 7. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, au moins un inhibiteur du facteur de croissance épidermique liant l'héparine HB-EGF ou au moins un inhibiteur des récepteurs ErbB ou au moins un inhibiteur des voies de transduction associées en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 15 8. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un inhibiteur du facteur de croissance épidermique liant l'héparine HB-EGF ou au moins un inhibiteur de ses récepteurs ou au moins un inhibiteur des voies de transduction associées en association avec au moins un inhibiteur de IL-6 ou au moins un inhibiteur du récepteur de IL-6 ou au moins un inhibiteur de ses récepteurs ou au moins un
- 20 inhibiteur des voies de transduction associées, lesdits inhibiteurs étant conditionnés ensemble ou séparément en combinaison avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

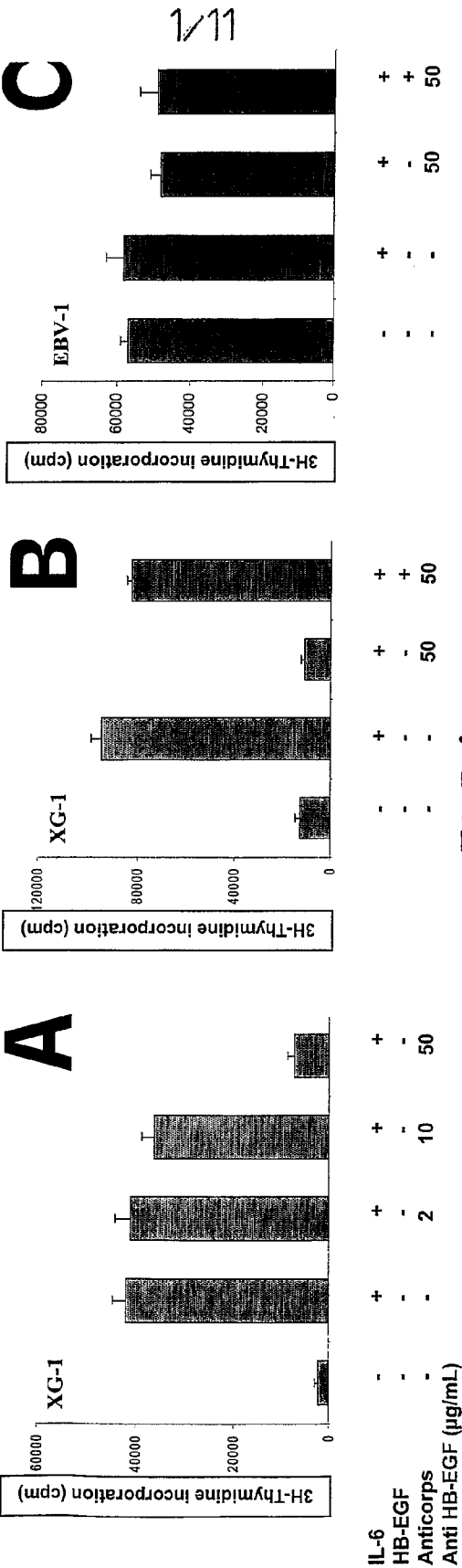


FIG.1

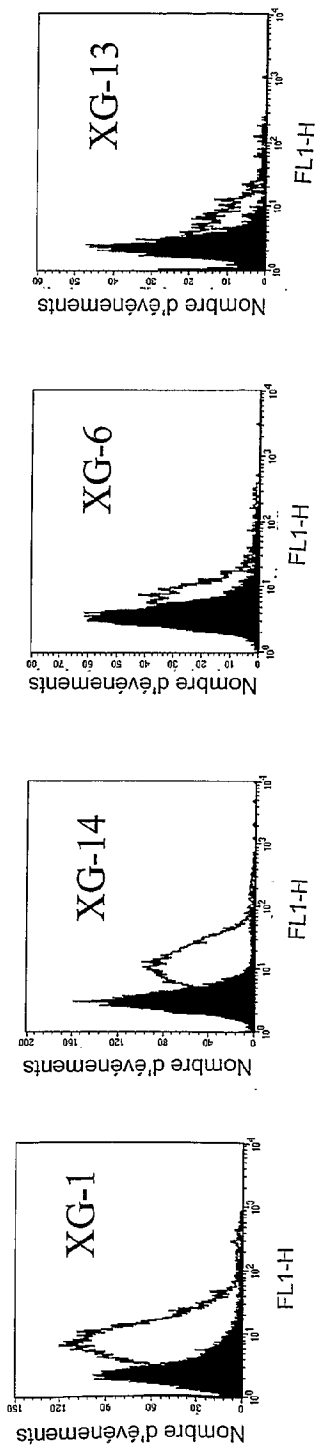
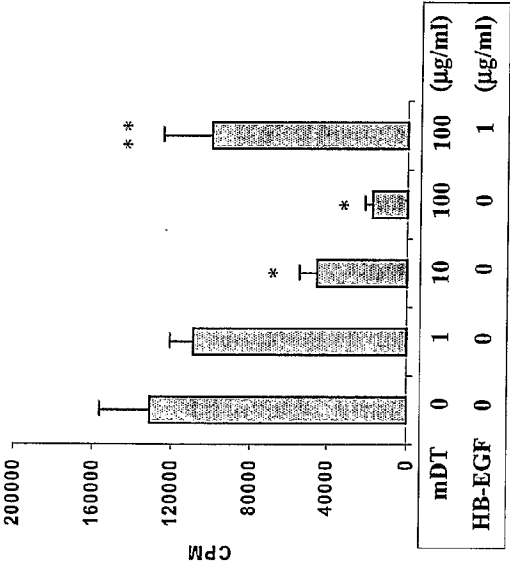


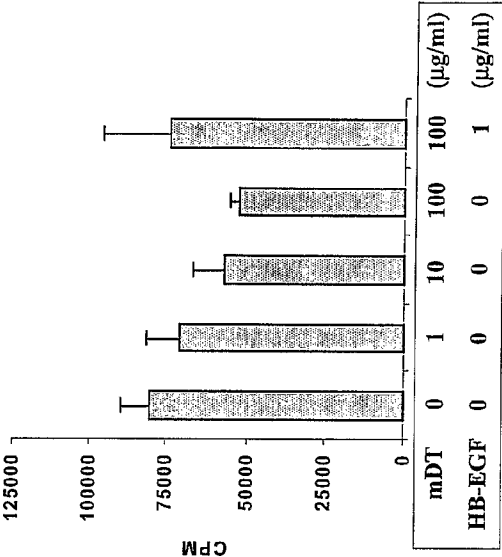
FIG. 2

FIG.3

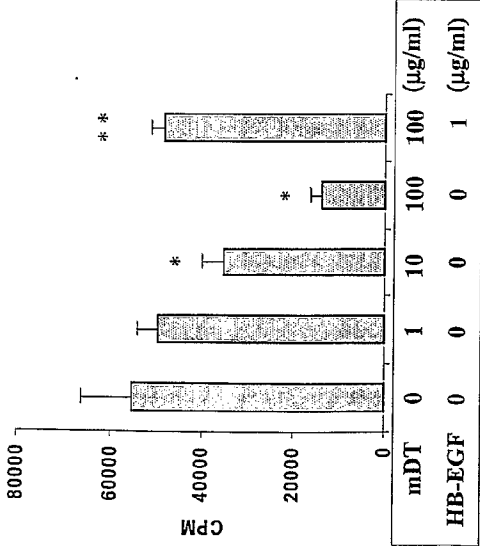
XG-14



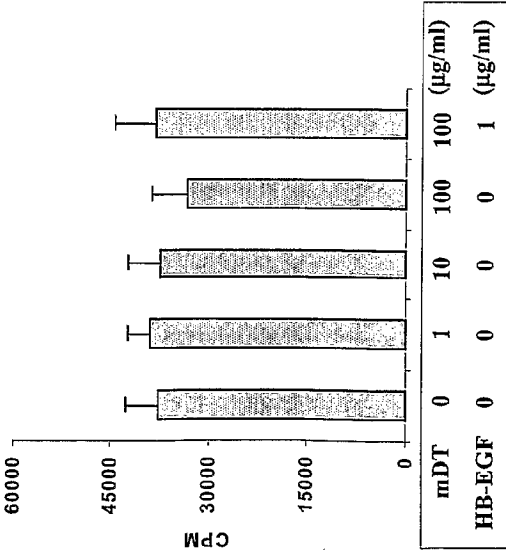
XG-13



XG-1



XG-6



4/11

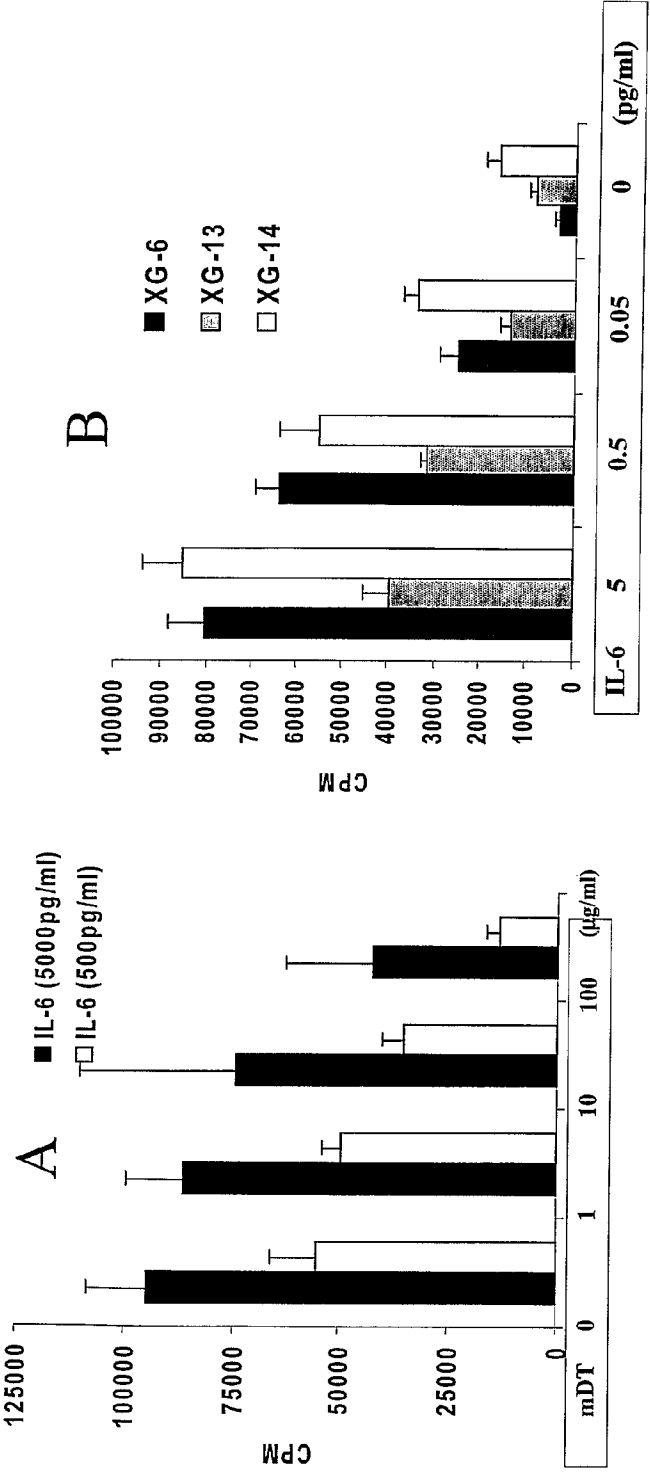


FIG.4

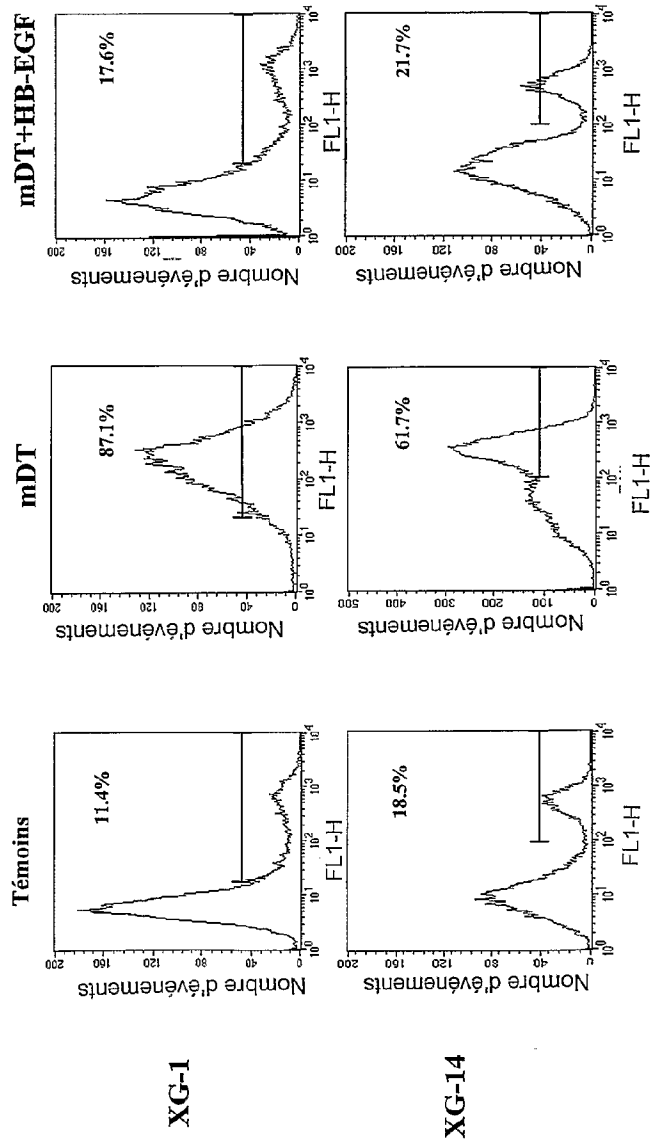


FIG.5

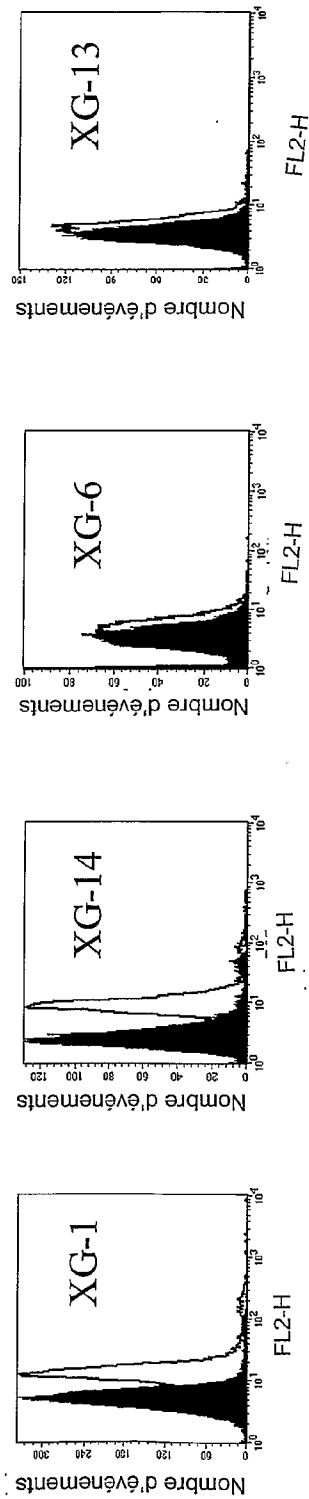


FIG.6

7/11

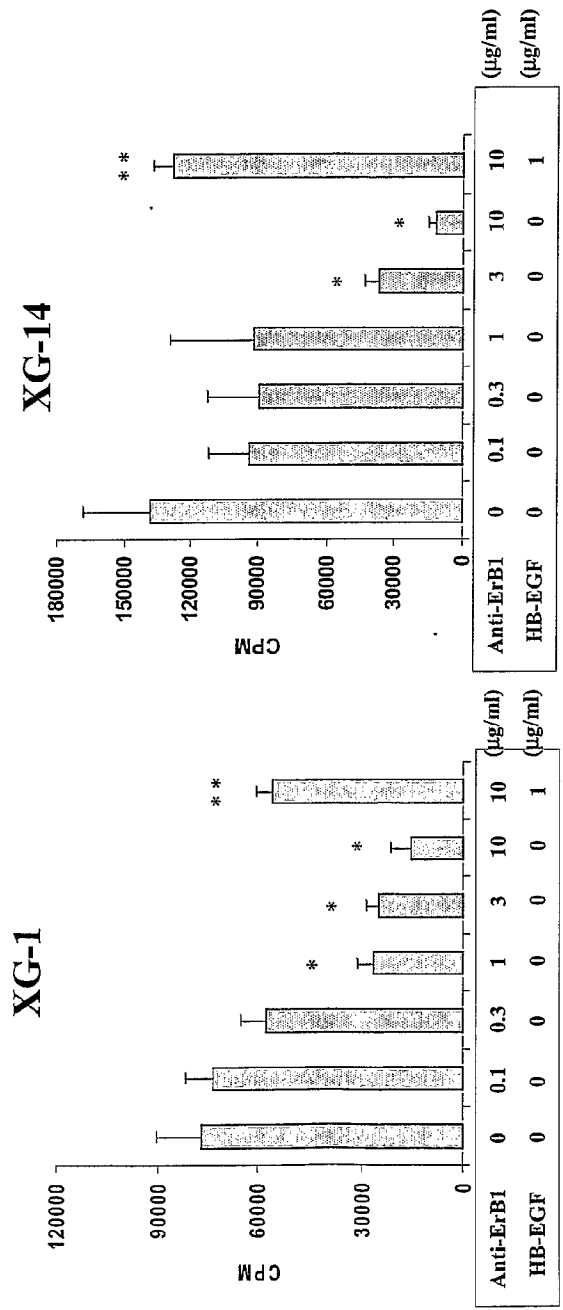


FIG.7

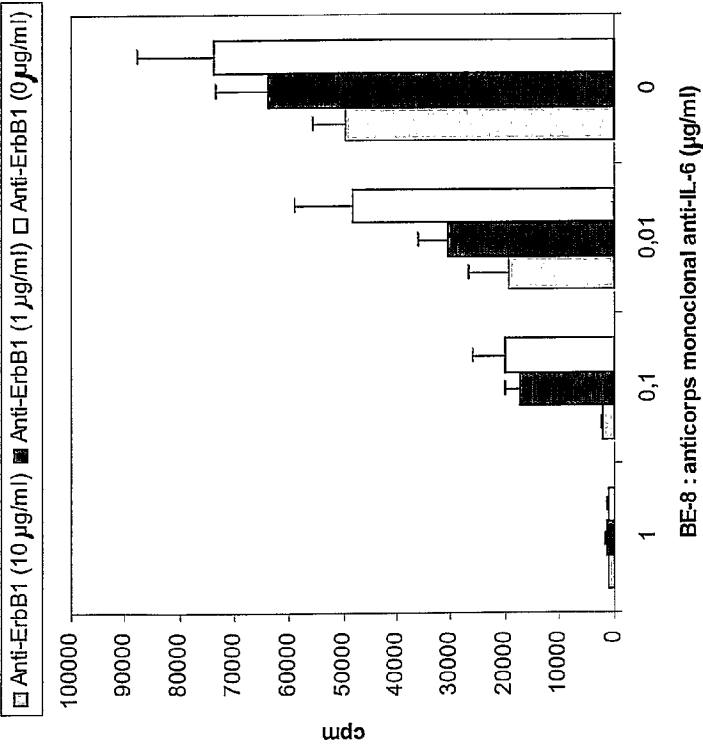


FIG.8

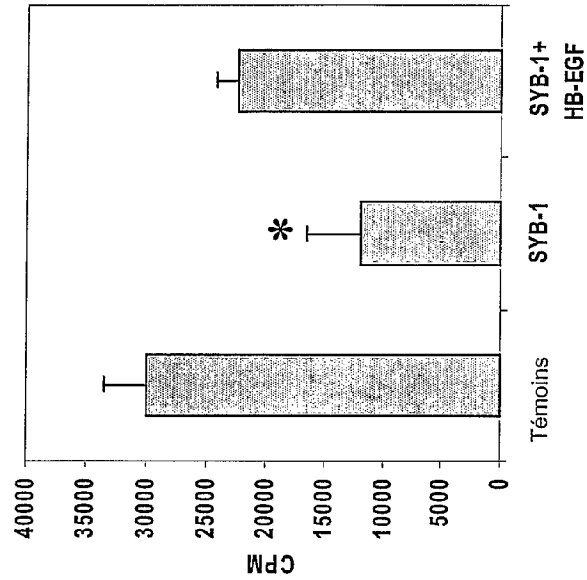
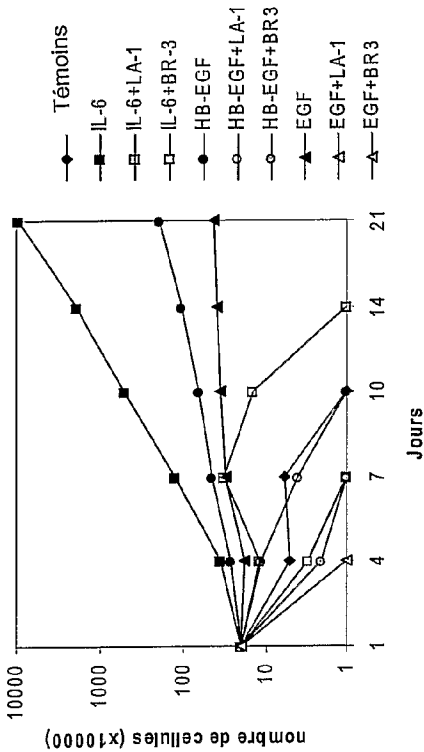


FIG.9

10/11

XG-14



XG-1

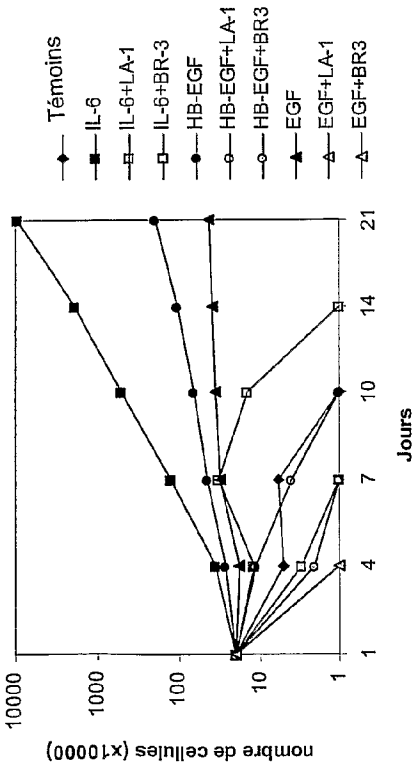


FIG.10

XG-1 XG-6 XG-13 XG-14

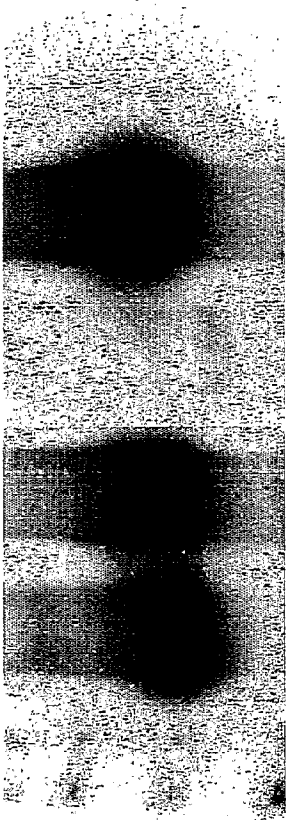


FIG.11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/00 A61K31/727 A61K39/05 A61K39/395 A61K45/06
/(A61K39/395, 31:56, 38:20, 38:21), (A61K31/727, 31:56, 38:20, 38:21),
(A61K39/05, 1:56, 38:20, 38:21)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBASE, EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, PASCAL, PHARMAPROJECT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 090 794 A (R. L. MARTUZA ET AL.) 18 July 2000 (2000-07-18) the whole document ---	7,8
X	US 4 757 056 A (C. L. VAN GORP ET AL.) 12 July 1988 (1988-07-12) the whole document ---	7,8
X	US 5 366 874 A (J. EIDELS ET AL.) 22 November 1994 (1994-11-22) ---	7
A	abstract column 10, line 53 - line 68 column 16, line 15 - line 19 column 21 column 25, line 1 - line 18 --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2002

Date of mailing of the international search report

19/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02777

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; retrieved from EPOQUE BIOSIS Database accession no. prev200100312143 XP002199053 abstract & DE VOS ET AL.: "Distinctive intracellular signaling gene expression in malignant plasma cells identified by clustering analysis of myeloma versus autologous lymphoblastoid cell lines" BLOOD, vol. 96, no. 11pt1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 700a abstract</p> <p>---</p>	1-5
Y	<p>RAAB G ET AL: "HEPARIN-BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1333, no. 3, 1997, pages E179-E199, XP000961069 ISSN: 0006-3002</p> <p>---</p>	1-5,8
A	<p>le document en entier, surtout page F184 colonne de droite paragraph 2, page F185 colonne de droite, page F186, page F188 colonne de gauche 2ème paragraphe, et colonne de droite 1er paragraphe page F190 page F191, right-hand column page F192</p> <p>---</p>	7
Y	<p>CHADWICK D.E. ET AL: "Differential sensitivity of human myeloma cell lines and normal bone marrow colony forming cell to a recombinant diphtheria toxin- interleukin 6 fusion protein." BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, (1993) 85/1 (25-36)., XP008002427</p> <p>---</p>	8
A	<p>page 25 page 26, left-hand column, paragraphs 1-3 * page 27 "results" * page 28 -page 32, left-hand column page 33 -page 35</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02777

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 07407 A (CHILDREN'S HOSPITAL RESEARCH FOUNDATION) 18 February 1999 (1999-02-18)	8
A	page 7, line 24 - line 31 page 16, line 7 - line 28 page 17 -page 19, line 10 ---	1,2
A	US 6 235 884 B1 (M. KLAGBRUN ET AL.) 22 May 2001 (2001-05-22) surtout les colonnes 21-24 "use" ---	1,3,4,7
A	IWAMOTO R ET AL: "HEPARIN-BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR, WHICH ACTS AS THE DIPHTHERIA TOXIN RECEPTOR, FORMS A COMPLEX WITH MEMBRANE PROTEIN DRAP27/CD9, WHICH UP-REGULATES FUNCTIONAL RECEPTORS AND DIPHTHERIA TOXIN SENSITIVITY" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 13, 1994, pages 2322-2330, XP001064892 ISSN: 0261-4189 the whole document ---	1,3,4,7
A	SHALLAL ET AL.: "CD9 expression enhances the susceptibility of myeloma cell lines to cell-mediated cytotoxicity" BLOOD, vol. 96, no. 1, July 2000 (2000-07), pages 224-233, XP002199051 the whole document ---	1-4,7
A	MITAMURA T ET AL: "DIPHTHERIA TOXIN BINDS TO THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF)-LIKE DOMAIN OF HUMAN HEPARIN-BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR/DIPHTHERIA TOXIN RECEPTOR AND INHIBITS SPECIFICALLY ITS MITOGENIC ACTIVITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 270, no. 3, 20 January 1995 (1995-01-20), pages 1015-1019, XP002912324 ISSN: 0021-9258 the whole document --- -/--	1,3,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02777

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BESNER ET AL.: "Interaction of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) with the epidermal growth factor receptor: modulation by heparin, heparinase, or synthetic heparin-binding HB-EGF fragments" GROWTH FACTORS, vol. 7, 1992, pages 289-296, XP008003012 the whole document ---	1,3,7
A	US 6 172 042 B1 (J. CHEBATH ET AL.) 9 January 2001 (2001-01-09) the whole document ---	2,6,8
A	KAWANO ET AL.: "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas" NATURE, vol. 332, 3 March 1988 (1988-03-03), pages 83-85, XP002199052 cited in the application the whole document ---	2,5,8
A	DATABASE MEDLINE 'Online! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM8977259 XP002199054 abstract & PUTHIER ET AL.: "Myeloma cell growth arrest, apoptosis, and interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D3 derivative, alone or in association with dexamethasone" BLOOD, vol. 88, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 4659-4666, abstract ---	2,5,6,8
A	DATABASE MEDLINE 'Online! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM2592570 XP002199055 abstract & BATAILLE ET AL.: "Serum levels of interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias" J. CLIN. INVEST., vol. 84, no. 6, December 1989 (1989-12), pages 2008-2011, abstract ---	2,5,8
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02777

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM7989587 XP002199056 abstract & SCHWABE ET AL.: "Disruption by interferon-alpha of an autocrine interleukin-6 growth loop in IL-6 dependent U266 myeloma cells by homologous and heterologous down-regulation of the IL-6 receptor alpha- and beta-chains" J. CLIN. INVEST., vol. 94, no. 6, December 1994 (1994-12), pages 2317-2325, abstract</p>	2,5,6,8
A	<p>--- RUIZ-ARGÜELLES ET AL.: "Cell surface markers in multiple myeloma" MAYO CLINIC PROC., vol. 69, no. 7, July 1994 (1994-07), pages 684-690, XP008002967 page 686 "IL-6 and its receptor"</p>	2,5,8
A	<p>--- DATABASE MEDLINE 'Online! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM 8603522 XP002199057 abstract & LEVY ET AL.: "Retinoic acid modulates the in vivo and in vitro growth of IL-6 autocrine human myeloma cell lines via induction of apoptosis" CLIN. EXP. IMMUNOLOGY, vol. 104, no. 1, April 1996 (1996-04), pages 167-172, abstract</p>	2,5,8
A	<p>--- VINANTE F ET AL: "HEPARIN-BINDING EPIDERMAL GROWTH FACTOR-LIKE GROWTH FACTOR/DIPHTHERIA TOXIN RECEPTOR EXPRESSION BY ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 5, no. 93, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 1715-1723, XP001066282 ISSN: 0006-4971 the whole document</p> <p>--- -/--</p>	1,3,4,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02777

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DE VOS ET AL.: "Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays" BLOOD, vol. 98, no. 3, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 771-778, XP001076688 le document en entier et plus particulièrement la page 778. ---	1,3
P,X	DE VOS ET AL.: "Comparing myeloma cells to normal plasma cells by using oligonucleotides microarrays: toward new therapeutic targets" BLOOD, vol. 98, no. 11-1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 570a XP001068208 résumé 2387 -----	1,3,4,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/02777

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

The current Claims 1, 2, 4, 6-8 relate to compounds defined in terms of a desired characteristic or property, namely "a heparin-binding epidermal growth factor (EGF) inhibitor" (hereinafter designated as HB-EGF) or "an HB-EGF receptor (or erbB receptor) inhibitor" or "one or more inhibitors of the associated transduction pathways" (associated with HB-EGF or IL-6) or "an IL-6 inhibitor" or "an IL-6 receptor inhibitor" or "an IL-6 production inhibitor" or "any other HB-EGF receptor" (Claim 4). The claims cover all the compounds that have this characteristic or property, while the application only provides support for a very small portion of such compounds.

Moreover, the term "corticoids" (Claim 5) covers a very large number of different compounds.

In fact, this expression contains so many alternatives that the resulting lack of clarity and conciseness prevents a reasonable search covering the subject matter of the claim from being carried out. In addition, the description does not provide any example supporting the use of such compounds, or any example of "IL-6 production inhibitors" (Claim 5).

In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a reasonable search covering the entire range of protection sought.

Notwithstanding the above reasons, the claims also lack clarity. Indeed, they attempt to define the therapeutic use of said compounds in terms of the result to be achieved (inducing apoptosis and/or inhibiting the proliferation of IL-6 dependent plasma cell tumour cells). Only the therapeutic use of compounds for treating specific diseases or disorders is industrially applicable.

In the present case, the claims lack clarity to such an extent that it appears impossible to carry out a reasonable search covering the entire range of protection sought.

Consequently, the search has only been carried out for those parts of the claims directed to a clear, supported and sufficiently disclosed subject matter, i.e. the parts relating to the compounds mentioned in Claim 3, anti-erbB monoclonal antibodies, anti-CD9 antibodies, and, as regards the combinations, anti-IL-6 monoclonal antibodies, antagonist mutated IL-6 and inhibitors of the IL-6 receptor gp80 or gp130 chains, for the treatment of multiple myeloma and IL-6 dependent plasma cell tumours.

The applicant should note that claims or parts of claims directed to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that, in its capacity as International Preliminary Examining Authority, the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/02777

will apply whether or not the claims have been amended after receipt of the international search report or in the course of any procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/02777

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6090794	A	18-07-2000	US 6362392 B1	26-03-2002
US 4757056	A	12-07-1988	NONE	
US 5366874	A	22-11-1994	NONE	
WO 9907407	A	18-02-1999	US 5876730 A	02-03-1999
			AU 744585 B2	28-02-2002
			AU 8696298 A	01-03-1999
			BR 9811861 A	15-08-2000
			CN 1276729 T	13-12-2000
			EP 1003545 A1	31-05-2000
			JP 2001513334 T	04-09-2001
			NO 20000579 A	25-02-2000
			WO 9907407 A1	18-02-1999
			US 2001007019 A1	05-07-2001
US 6235884	B1	22-05-2001	US 5811393 A	22-09-1998
US 6172042	B1	09-01-2001	AU 709585 B2	02-09-1999
			AU 6999396 A	30-04-1997
			CA 2230949 A1	17-04-1997
			EP 0852587 A2	15-07-1998
			WO 9713781 A2	17-04-1997
			JP 2000500644 T	25-01-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/02777

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/00 A61K31/727 A61K39/05 A61K39/395 A61K45/06
 //(A61K39/395, 31:56, 38:20, 38:21), (A61K31/727, 31:56, 38:20, 38:21),
 (A61K39/05, 1:56, 38:20, 38:21)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EMBASE, EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, PASCAL, PHARMAPROJECT

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 090 794 A (R. L. MARTUZA ET AL.) 18 juillet 2000 (2000-07-18) le document en entier ---	7,8
X	US 4 757 056 A (C. L. VAN GORP ET AL.) 12 juillet 1988 (1988-07-12) le document en entier ---	7,8
X	US 5 366 874 A (J. EIDELS ET AL.) 22 novembre 1994 (1994-11-22)	7
A	abrégé colonne 10, ligne 53 - ligne 68 colonne 16, ligne 15 - ligne 19 colonne 21 colonne 25, ligne 1 - ligne 18 --- -/--	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 décembre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/12/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gac, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; retrieved from EPOQUE BIOSIS Database accession no. prev200100312143 XP002199053 abrégé & DE VOS ET AL.: "Distinctive intracellular signaling gene expression in malignant plasma cells identified by clustering analysis of myeloma versus autologous lymphoblastoid cell lines" BLOOD, vol. 96, no. 11pt1, 16 novembre 2000 (2000-11-16), page 700a abrégé</p> <p>---</p>	1-5
Y	<p>RAAB G ET AL: "HEPARIN-BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1333, no. 3, 1997, pages E179-E199, XP000961069 ISSN: 0006-3002</p>	1-5,8
A	<p>le document en entier, surtout page F184 colonne de droite paragraph 2, page F185 colonne de droite, page F186, page F188 colonne de gauche 2ème paragraphe, et colonne de droite 1er paragraphe page F190 page F191, colonne de droite page F192</p> <p>---</p>	7
Y	<p>CHADWICK D.E. ET AL: "Differential sensitivity of human myeloma cell lines and normal bone marrow colony forming cell to a recombinant diphtheria toxin- interleukin 6 fusion protein." BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, (1993) 85/1 (25-36)., XP008002427</p>	8
A	<p>page 25 page 26, colonne de gauche, alinéas 1-3 * page 27 "results" * page 28 -page 32, colonne de gauche page 33 -page 35</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,2,5

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 99 07407 A (CHILDREN'S HOSPITAL RESEARCH FOUNDATION) 18 février 1999 (1999-02-18)	8
A	page 7, ligne 24 - ligne 31 page 16, ligne 7 - ligne 28 page 17 -page 19, ligne 10 ---	1,2
A	US 6 235 884 B1 (M. KLAGBRUN ET AL.) 22 mai 2001 (2001-05-22) surtout les colonnes 21-24 "use" ---	1,3,4,7
A	IWAMOTO R ET AL: "HEPARIN-BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR, WHICH ACTS AS THE DIPHTHERIA TOXIN RECEPTOR, FORMS A COMPLEX WITH MEMBRANE PROTEIN DRAP27/CD9, WHICH UP-REGULATES FUNCTIONAL RECEPTORS AND DIPHTHERIA TOXIN SENSITIVITY" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 13, 1994, pages 2322-2330, XP001064892 ISSN: 0261-4189 le document en entier ---	1,3,4,7
A	SHALLAL ET AL.: "CD9 expression enhances the susceptibility of myeloma cell lines to cell-mediated cytotoxicity" BLOOD, vol. 96, no. 1, juillet 2000 (2000-07), pages 224-233, XP002199051 le document en entier ---	1-4,7
A	MITAMURA T ET AL: "DIPHTHERIA TOXIN BINDS TO THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF)-LIKE DOMAIN OF HUMAN HEPARIN-BINDING EGF-LIKE GROWTH FACTOR/DIPHTHERIA TOXIN RECEPTOR AND INHIBITS SPECIFICALLY ITS MITOGENIC ACTIVITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 270, no. 3, 20 janvier 1995 (1995-01-20), pages 1015-1019, XP002912324 ISSN: 0021-9258 le document en entier ---	1,3,7

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BESNER ET AL.: "Interaction of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) with the epidermal growth factor receptor: modulation by heparin, heparinase, or synthetic heparin-binding HB-EGF fragments"</p> <p>GROWTH FACTORS, vol. 7, 1992, pages 289-296, XP008003012 le document en entier</p> <p>---</p>	1,3,7
A	<p>US 6 172 042 B1 (J. CHEBATH ET AL.) 9 janvier 2001 (2001-01-09) le document en entier</p> <p>---</p>	2,6,8
A	<p>KAWANO ET AL.: "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas"</p> <p>NATURE, vol. 332, 3 mars 1988 (1988-03-03), pages 83-85, XP002199052 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	2,5,8
A	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM8977259 XP002199054 abrégé</p> <p>& PUTHIER ET AL.: "Myeloma cell growth arrest, apoptosis, and interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D3 derivative, alone or in association with dexamethasone"</p> <p>BLOOD, vol. 88, no. 12, 15 décembre 1996 (1996-12-15), pages 4659-4666, abrégé</p> <p>---</p>	2,5,6,8
A	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM2592570 XP002199055 abrégé</p> <p>& BATAILLE ET AL.: "Serum levels of interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias"</p> <p>J. CLIN. INVEST., vol. 84, no. 6, décembre 1989 (1989-12), pages 2008-2011, abrégé</p> <p>---</p>	2,5,8

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM7989587 XP002199056 abrégé & SCHWABE ET AL.: "Disruption by interferon-alpha of an autocrine interleukin-6 growth loop in IL-6 dependent U266 myeloma cells by homologous and heterologous down-regulation of the IL-6 receptor alpha- and beta-chains" J. CLIN. INVEST., vol. 94, no. 6, décembre 1994 (1994-12), pages 2317-2325, abrégé</p>	2,5,6,8
A	<p>--- RUIZ-ARGÜELLES ET AL.: "Cell surface markers in multiple myeloma" MAYO CLINIC PROC., vol. 69, no. 7, juillet 1994 (1994-07), pages 684-690, XP008002967 page 686 "IL-6 and its receptor" ---</p>	2,5,8
A	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! retrieved from EPOQUE MEDLINE Database accession no. NLM 8603522 XP002199057 abrégé & LEVY ET AL.: "Retinoic acid modulates the in vivo and in vitro growth of IL-6 autocrine human myeloma cell lines via induction of apoptosis" CLIN. EXP. IMMUNOLOGY, vol. 104, no. 1, avril 1996 (1996-04), pages 167-172, abrégé</p>	2,5,8
A	<p>--- VINANTE F ET AL: "HEPARIN-BINDING EPIDERMAL GROWTH FACTOR-LIKE GROWTH FACTOR/DIPHThERIA TOXIN RECEPTOR EXPRESSION BY ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 5, no. 93, 1 mars 1999 (1999-03-01), pages 1715-1723, XP001066282 ISSN: 0006-4971 le document en entier ---</p>	1,3,4,7
	<p>--- -/--</p>	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	DE VOS ET AL.: "Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays" BLOOD, vol. 98, no. 3, 1 août 2001 (2001-08-01), pages 771-778, XP001076688 le document en entier et plus particulièrement la page 778. ---	1,3
P,X	DE VOS ET AL.: "Comparing myeloma cells to normal plasma cells by using oligonucleotides microarrays: toward new therapeutic targets" BLOOD, vol. 98, no. 11-1, 16 novembre 2001 (2001-11-16), page 570a XP001068208 résumé 2387 -----	1,3,4,7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALEDemande internationale n°
PCT/FR 02/02777**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} – se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1,2,4,6-8 présentes ont trait à des composés définis en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir "un inhibiteur du facteur de croissance épidermique (EGF) liant l'héparine" (ci-après nommé HB-EGF), ou "un inhibiteur des récepteurs de HB-EGF (ou récepteurs erbB)" ou "un/des inhibiteur(s) des voies de transduction associées" (à HB-EGF ou IL-6) ou "un inhibiteur de l'IL-6" ou "un inhibiteur du récepteur de l'IL-6" ou "un inhibiteur de la production de l'IL-6" ou "autre récepteur de HB-EGF" (revendication 4).

Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement que pour un nombre très limité de tels composés.

De plus, le terme "corticoïdes" (revendication 5) couvre un très grand nombre de composés différents

En fait, cette expression contient tant d'options possibles que le manque de clarté et de concision qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par ailleurs aucun exemple n'est donné dans la description pour supporter l'utilisation de tels composés, pas plus qu'il n'est fourni d'exemple d'"inhibiteurs de la production de l'IL-6" (revendication 5).

Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir l'application thérapeutique de ces composés au moyen du résultat à atteindre (induction de l'apoptose et/ou inhibition de la prolifération des cellules tumorales plasmocytaires IL-6 dépendantes). Seule l'utilisation thérapeutique de composés dans le but de traiter des maladies ou des troubles particuliers est susceptible d'application industrielle.

Ce manque de clarté est, dans le cas présent, tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les composés mentionnés dans la revendication 3, les anticorps monoclonaux anti erbB, les anticorps anti-CD9, et, pour les combinaisons, les anticorps monoclonaux anti IL-6, l'IL-6 mutée antagoniste, les inhibiteurs de la chaîne gp80 ou gp130 du récepteur de l'IL-6, dans le traitement du myelome multiple et des tumeurs plasmocytaires IL-6 dépendantes.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/02777

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6090794	A	18-07-2000	US 6362392 B1	26-03-2002
US 4757056	A	12-07-1988	AUCUN	
US 5366874	A	22-11-1994	AUCUN	
WO 9907407	A	18-02-1999	US 5876730 A	02-03-1999
			AU 744585 B2	28-02-2002
			AU 8696298 A	01-03-1999
			BR 9811861 A	15-08-2000
			CN 1276729 T	13-12-2000
			EP 1003545 A1	31-05-2000
			JP 2001513334 T	04-09-2001
			NO 20000579 A	25-02-2000
			WO 9907407 A1	18-02-1999
			US 2001007019 A1	05-07-2001
US 6235884	B1	22-05-2001	US 5811393 A	22-09-1998
US 6172042	B1	09-01-2001	AU 709585 B2	02-09-1999
			AU 6999396 A	30-04-1997
			CA 2230949 A1	17-04-1997
			EP 0852587 A2	15-07-1998
			WO 9713781 A2	17-04-1997
			JP 2000500644 T	25-01-2000